

产壳聚糖酶的海洋青霉菌筛选 及其寡营养发酵的探究

朱利平, 黄惠莉*

(华侨大学化工学院, 福建厦门 361021)

摘要: 从海边海螺、贝壳及其附着物的微生物中筛选出产壳聚糖酶的青霉菌。以此菌为出发菌, 以降低发酵产酶成本为目的, 采用不同的发酵温度, 分别添加不同诱导物进行发酵产酶, 探讨温度、诱导物对菌种生长、酶活性的影响。实验结果表明: 低聚糖诱导产酶效果最好, 室温 25℃ 进行壳聚糖酶发酵, 普通培养基酶活力最高达 3.57U/mL。海水寡营养发酵产酶的适宜培养基配方为(g/L): 蛋白胨 9g、葡萄糖 10g 的海水培养基, 酶活力可以达到 3.16U/mL, 初步实现利用海水进行寡营养发酵产酶, 该菌株具有工业应用潜力。

关键词: 壳聚糖酶, 寡营养发酵, 海洋青霉菌

Study on screening of chitosanase-producing marine *Penicillium* and its oligotrophic medium fermentation conditons

ZHU Li-ping, HUANG Hui-li*

(Chemical Engineering College, Huaqiao University, Xiamen 361021, China)

Abstract: A marine *Penicillium* sp.PCS-7 was isolated from whelk and shell by the seaside. In order to reduce the cost of fermentation, different inducer was added into culture medium and incubated in different temperature, and the effects of temperature and inducer on growth and enzyme activity were studied. Result: oligosaccharide as inducer showed best result for fermentation. The maximal chitosanase activity in common medium could reach 3.57U/mL at 25℃. The optimal composition of oligotrophic medium for *Penicillium* sp.PCS-7 producing chitosanase was as follows (g/L): bacteriological peptone 9g, glucose 10g and the maximal chitosanase activity could reach 3.16U/mL. Initially achieved by using seawater for fermentation and this strain has the potential for industrial applications.

Key words: chitosanase; oligotrophic; marine *Penicillium*

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2011)05-0212-04

甲壳素是 2-乙酰氨基-2-脱氧-D-葡萄糖残基通过 β -(1-4) 糖苷键连接形成的生物大分子聚合物^[1-2], 在地球上含量仅次于纤维素, 但是由于其在水溶液和有机溶剂中不溶, 不能直接利用。壳聚糖是甲壳素经脱乙酰作用后形成的产物, 是自然界中唯一存在的碱性多糖, 在医药卫生、食品工业、废水处理、轻工纺织和农业上都有广泛的应用^[3-8], 但是一般制得的壳聚糖的分子量很大, 只能溶于某些酸性溶液之中, 而且某些特殊功能只有将壳聚糖降解成壳寡糖后才能表现出来^[9-12]。壳寡糖是由氨基葡萄糖通过 β -(1-4)-糖苷键连接而成^[13], 是壳聚糖的降解产物, 易被吸收利用。在医药卫生^[14-17]、农业生产^[18-20]上都有重要的应用, 尤其是某些特殊的壳寡

糖(如壳六糖)具有提高人体免疫力, 抑制肿瘤细胞生长、促进抗体生成、降血压、降血糖、调节胆固醇、减肥、预防成人疾病等功能^[9-21], 具有极高的应用价值和经济价值。目前, 降解壳聚糖成为壳寡糖的主要方法有化学降解法和酶降解法。化学法便于工业化生产, 但是对环境污染较大, 生产过程较难控制, 产物范围不均一; 酶解法是环境友好型降解, 具有高效性, 可以产生具有极高应用价值的特异性产物, 是较为理想的方法。壳聚糖酶(Chitosanase EC 3.2.1.99)是 1973 年 Monaghan 等^[22]首先提出来的, 它是一种对线性壳聚糖具有分解作用的专一性酶, 可以选择性地、特异地切断壳聚糖的 β -(1-4)-糖苷键, 得到特异分子量范围的壳寡糖。国内学者对其酶解方式已有较深入的研究^[23], 近年来利用壳聚糖酶降解已有多篇报道^[24-25], 其中很多学者对筛选出的菌种进行改良^[26, 28, 30]或优化培养基提高菌种的产酶能力^[29], 但是大规模工业化生产的报道并不多见。目前大部分研究的微生物产壳聚糖酶活力还普遍较

收稿日期: 2010-04-08 * 通讯联系人

作者简介: 朱利平(1986-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 几丁质、壳聚糖食品微生物转化。

基金项目: 福建省自然科学基金重点项目基金(2007T010)。

低^[26-30], 而真正产酶量大^[31-32]、适用于工业化大规模生产的菌株很少, 生产成本低、生成产物不易控制等原因导致商品壳聚糖酶价格居高不下。本研究从海洋中筛选出产壳聚糖酶的微生物, 利用生物法进行壳聚糖的降解, 同时利用海洋微生物蕴涵着次生代谢物质多样性的巨大潜在资源, 进行降低培养基成本的实验研究; 利用海水取代常用培养基中的无机盐离子和各种微量元素, 仅添加少量碳源和氮源, 并加入不同的诱导物, 在不同的温度条件下发酵产酶。为工业化生产低聚糖打下一定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

壳聚糖 脱乙酰度 $\geq 90.0\%$, SCRC 国药集团化学试剂有限公司提供; 低聚糖 分子量低于 3000, 青岛弘海生物技术有限公司; 其它试剂 均为国产分析纯; 海水 盐度为 5% 的海水, 取自厦门集美浔江海域; 初筛平板培养基 (g/L) 10g 壳聚糖, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.5g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.25g, K_2HPO_4 0.02g, NaCl 4g, CaCO_3 6g, 琼脂 20g, pH6.0; 种子培养基 (g/L) 淀粉 10g, 酵母膏 1g, 葡萄糖 20g, 蛋白胨 5g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.5g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.25g, K_2HPO_4 0.02g, NaCl 4g, CaCO_3 6g, pH 7.2; 发酵培养基 (g/L) 淀粉 20g, 酵母膏 1g, 葡萄糖 10g, 蛋白胨 9g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.25g, NaCl 4g, CaCO_3 3g, pH 7.2; 六种寡营养培养基 (g/L) 分别以不同的诱导物代替培养基发酵培养基中的营养物质 (淀粉、酵母膏和其余的无机盐离子), 然后添加不同的诱导物配制六种寡营养培养基: 1 号寡营养培养基: 壳聚糖 10g, pH7.2, 盐度 5% 海水; 2 号寡营养培养基: 蛋白胨 9g, 壳聚糖 10g, pH7.2, 盐度 5% 海水; 3 号寡营养培养基: 葡萄糖 10g, 壳聚糖 10g, pH7.2, 盐度 5% 海水; 4 号寡营养培养基: 蛋白胨 9g, 葡萄糖 10g, 脱乙酰度 50% 的几丁质 10g, pH7.2, 盐度 5% 海水; 5 号寡营养培养基: 蛋白胨 9g, 葡萄糖 10g, 壳聚糖 10g, pH7.2, 盐度 5% 海水; 6 号寡营养培养基: 蛋白胨 9g, 葡萄糖 10g, 低聚糖 10g, pH7.2, 盐度 5% 海水。

1.2 实验方法

1.2.1 产壳聚糖酶的海洋青霉菌的筛选及其初步鉴定

1.2.1.1 产壳聚糖酶菌株的平板初筛 福建崇武海边取回海螺、贝壳, 将其粉碎, 加入一定量的海水混合均匀, 经离心分离后取其上清液, 涂布于初筛培养基, 放入培养箱 25℃ 培养, 然后选取培养基上透明圈直径和菌落直径比值较大的菌落进行平板复筛。

1.2.1.2 产壳聚糖酶菌株的平板复筛 采用划线法在筛选培养基平板上进行多次的筛选, 选取平板上透明圈和菌落直径比值较大的单菌落。经斜面保存并作为摇瓶发酵复筛的出发菌。

1.2.1.3 产壳聚糖酶的摇瓶复筛 挑取透明圈和菌落直径比较大的菌株, 经菌株活化后, 接种于发酵培养基中进行发酵产酶, 通过测定酶活大小, 进行菌株复筛。

1.2.1.4 菌株的初步鉴定 以菌株的形态学特征和

采用电子显微镜观察的方法, 进行菌株的初步鉴定。
1.2.2 温度变化对发酵产酶的影响 将斜面菌体接入种子培养基后在 120r/min, 25℃ 摇床中培养 3d。按发酵培养基配方, 配制 100mL 的发酵培养基 10 瓶, 分别按 3% 的接种量将种子培养基接入发酵培养基中。置于 120r/min, 一定温度的摇床中发酵。每隔 24h 取一瓶跟踪测定菌体干重和酶活力。

依据上述实验方法, 分别选择不同的发酵温度 (20、25、30、35、40℃) 进行摇床发酵, 测定菌体干重和酶活力, 通过酶活力的变化和菌体的长势确定适宜的发酵温度。

1.2.3 不同诱导物对产酶的影响 在发酵培养基的基础上, 分别加入 1% 几丁质 (脱乙酰度约为 50%)、1% 壳聚糖 (脱乙酰度 $\geq 90\%$) 和 1% 低聚糖三种不同的诱导物, 接种后置于摇床发酵培养, 跟踪测定菌体干重和酶活力。

1.2.4 寡营养海水培养基对发酵产酶的影响 依据六种寡营养培养基配方分别配制不同种寡营养发酵培养基, 接入 3% 种子培养基, 置于 25℃、120r/min 摇床发酵, 测其酶活力和菌体干重。

1.2.5 发酵参数测定

1.2.5.1 菌体干重 将每瓶发酵液于 10000r/min 冷冻 (4℃) 离心 20min, 取其沉淀菌体置于 100℃ 烘箱中, 烘干至恒重, 测其菌体干重。

1.2.5.2 壳聚糖酶活力 粗酶液制备: 将每瓶发酵液于 10000r/min 冷冻 (4℃) 离心 20min, 取上清液作为粗酶液。酶活力测定: 取粗酶液 2mL 与 2mL 1% 的壳聚糖溶液混合, 30℃ 下保温 20min, 调节混合液的 pH 大于 8.0, 离心去除絮状沉淀。取上清液 1mL, 用 DNS 法测定还原糖含量。酶活力单位 U 定义为: 上述条件下每分钟产生 1 μmol 还原糖所需酶量。

2 结果与讨论

2.1 菌株的筛选及其初步鉴定

采用初筛和复筛相结合的方法, 从海水中筛选出产壳聚糖酶的菌株, 菌株经壳聚糖培养基复筛后, 形成的产酶透明圈如图 1 所示。通过菌株的形态学特征和电子显微镜观察 (图 2) 初步鉴定该菌株属青霉菌属。

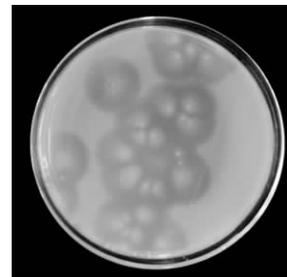


图 1 菌株初筛平板生长图

2.2 不同温度对发酵产酶的影响

以该菌为出发菌, 调节不同的温度进行发酵培养, 每个温度条件下定时测定发酵过程中壳聚糖酶活力与菌体干重变化, 结果如图 3、图 4 所示。从图 3 中可以看到, 在相同的发酵时间内, 25℃ 条件下酶活力最高, 这比现今报道^[27-28, 32] 的产壳聚糖酶菌株的培

表1 不同寡营养培养基培养时间和菌体干重最大值

寡营养培养基配方序号	1	2	3	4	5	6	原发酵培养基
培养时间(d)	4	7	7	4	5	5	5
菌体干重最大(g)	2.31	3.17	1.96	2.78	3.30	3.81	5.40

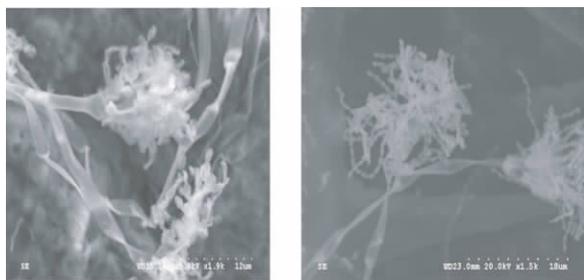


图2 电镜观察照片

养温度 28~37℃ 都要低,酶活力最高达 1.69U/mL。对比图 4 中菌体干重和酶活力曲线,酶活力最高峰出现在菌体生长曲线稳定期的后期,推断此菌所产壳聚糖酶是诱导型酶。

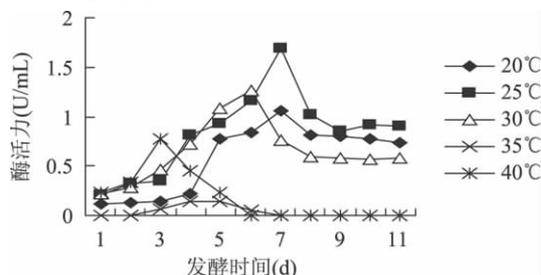


图3 不同发酵温度对酶活力的影响

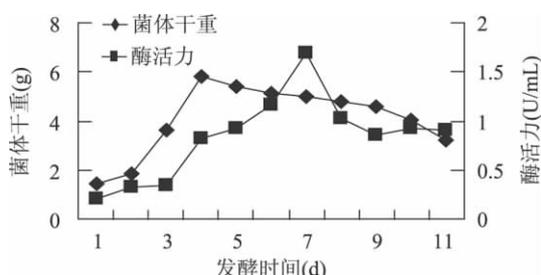


图4 25℃发酵过程中菌体干重和酶活力变化

2.3 不同诱导物对产酶的影响

由于此酶为诱导型酶,为了提高菌体产酶量,分别添加几丁质、壳聚糖和低聚糖三种诱导物进行诱导产酶,所得实验结果如图 5 所示。结果表明:低聚糖诱导产酶时,在第 7d 酶活力达到最高,最高值为 3.57U/mL,而以壳聚糖诱导产酶时在第 8d 酶活力达到最高,最高酶活力为 1.51U/mL;在均达到最大值时,低聚糖诱导产酶比壳聚糖诱导产酶的时间提前 1d,且低聚糖诱导产酶活力比壳聚糖诱导产酶活力提高了 2.36 倍。低聚糖诱导产酶与几丁质诱导产酶在酶活达到最高时所需时间相同,都是 7d。但低聚糖诱导产酶的最高酶活力比几丁质诱导产酶活力提高了 2.11 倍。该菌种产壳聚糖酶的具体诱导机制以及酶切类型^[23] 还需进一步的实验研究。

2.4 寡营养海水发酵产酶培养基

依据上述实验方法,观察该菌株在六种寡营养海水培养基条件下生长情况,测定生长过程中的菌体干重,各种寡营养培养基条件下测得菌体干重最

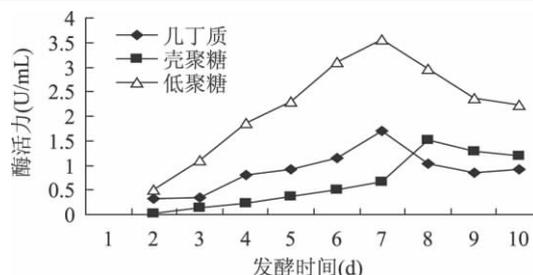


图5 不同诱导物诱导发酵液产酶曲线

大值如表 1 所示。

从表 1 结果可以看出,在寡营养培养基配方 1、3、4 号条件下菌体长势较差,这是由于营养成分过于贫瘠造成的,在培养基配方 2 号条件下菌体干重最大值的时间为 7d,这样就延长了发酵产酶时间。在寡营养培养基配方 5、6 号的发酵过程中,菌体干重达到最大值所需时间和原培养基配方条件下所需时间一致,都是在第 5d 达到最大,且长势较好。所以选取这两种培养基再次进行发酵培养,并跟踪测定壳聚糖酶活力,结果如图 6 所示,对比两种寡营养海水培养基对产酶活力的影响,低聚糖做诱导物产酶活力较高,且和原发酵培养基酶活力最大值相差不大,酶活力最高达 3.16U/mL,原发酵培养基酶活力最高达 3.57U/mL。初步说明利用海水进行寡营养发酵产酶是可行的,为工业化生产打下良好的基础。

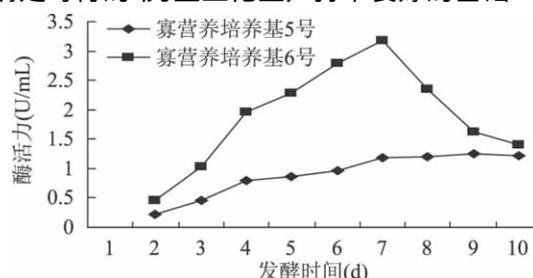


图6 两种寡营养培养基发酵产酶

3 结论

大规模发酵产壳聚糖酶的制约因素之一是培养基成本高,本实验用海水取代普通发酵培养基中各种无机盐离子和微量元素,仅向 100mL 海水中加入 1g 的葡萄糖和 0.9g 蛋白胨,利用寡营养发酵产酶的酶活力与普通发酵培养基发酵产酶的酶活力的最大值差别不大,初步实现了利用海水且降低培养基成本发酵产壳聚糖酶的工艺过程。

不同温度对发酵产酶影响实验,室温 25℃ 条件下发酵产酶活力最高,这是至今报道微生物产壳聚糖酶的最低的发酵温度,从而可以减少部分能源消耗。微生物产壳聚糖有组成型和诱导型之分,其中多数为诱导型。本研究中菌株产壳聚糖酶也为诱导型酶,在几丁质、壳聚糖和低聚糖诱导产酶实验中,低聚糖最适合诱导该菌产酶。

(下转第 414 页)

[6] Brendon D Gill, Harvey E Indyk. Development and application of a liquid chromatographic method for analysis of nucleotides and nucleosides in milk and infant formulas [J]. International Dairy Journal 2007, 17: 596-603.

[7] 王奇欣. 河豚鱼认识上的几个误区 [J]. 中国水产, 2005,

60: 18-19.

[8] Hwang Deng-Fwu, Chen Tai-Yuan, Jeng Sen-Shyong, et al. Seasonal variations of free amino acids and nucleotide-related compounds in the muscle of cultured Taiwanese puffer Takifugu rubripes [J]. Fisheries Science 2000, 66: 1123-1126.

(上接第 214 页)

本研究结果表明, 确定发酵产酶适宜条件为: 在 100mL 海水培养基中, 添加低聚糖 1g 为诱导物, 含有蛋白胨 0.9g、葡萄糖 1g, 在 25℃ 条件下进行寡营养发酵, 酶活力最高达 3.16U/mL。初步实现利用海水进行寡营养发酵, 25℃ 的发酵温度, 从而降低成本, 为工业化发酵生产打基础。

今后在寻找廉价的碳氮源、通过构建基因工程菌提高酶活力等方面有待进一步的实验探索。

参考文献

- [1] Mario Di F, Rapana P, Tomati U. Chitin and chitosan from Basidiomycetes [J]. Int J Biol Macromol 2008, 43(1): 8-12.
- [2] Marguerite Rinaudo. Chitin and chitosan: Properties and applications [J]. Prog Polym Sci 2006, 31(7): 603-632.
- [3] 蒋挺大. 壳聚糖 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2007.
- [4] 王爱勤. 甲壳素化学 [M]. 北京: 科学出版社, 2008.
- [5] 黄永春, 谢清若, 孔红星, 等. 壳聚糖-聚合氯化铝复合絮凝剂对糖浆脱色的研究 [J]. 食品工业科技, 2007, 28(8): 112-114.
- [6] 姜丽琴, 张国亮, 张凤宝, 等. 用于清除胆红素的壳聚糖膜的吸附性能研究 [J]. 高校化学工程学报, 2003, 17(2): 128-133.
- [7] 徐丽敏, 薛长湖, 李兆杰, 等. 水溶性壳聚糖对南美白对虾品质及腐败菌相变化的影响 [J]. 食品工业科技, 2008, 29(6): 107-110.
- [8] 屠洁, 刘冠卉, 程曦. 壳聚糖的抑菌效果研究及其与苯甲酸钠的比较 [J]. 食品工业科技, 2008, 29(5): 83-85.
- [9] 黄永春, 李琳, 郭祀远, 等. 壳聚糖酶解的研究 [J]. 化工进展, 2002, 21(6): 381-385.
- [10] 魏新林, 夏文水. 甲壳低聚糖生理活性研究进展 [J]. 中国药理学通报, 2003, 19(6): 614-617.
- [11] 李治, 刘晓非, 杨冬芝, 等. 壳聚糖降解研究进展 [J]. 化工进展, 2000, 19(6): 20-23.
- [12] 彭惠娥, 覃彩芹, 李伟. 壳寡糖拮抗离子型化学毒物对微生物的毒性研究 [J]. 食品科学, 2009, 30(9): 113-115.
- [13] Y-Wei Lin, Yi-Chien Hsiao, Been-Huang Chiang. Production of high degree polymerized chitooligosaccharides in a membrane reactor using purified chitosanase from Bacillus cereus [J]. Food Res Int 2009, 42(9): 1355-1361.
- [14] 韩永萍, 林强. 壳聚糖降解制备低聚壳聚糖和壳寡糖的研究进展 [J]. 食品科技, 2006, 31(7): 35-38.
- [15] 王鑫, 林强, 田平芳, 等. 低分子量壳寡糖改善 II 型糖尿病大鼠症状及其作用机制研究 [J]. 食品科学, 2007, 28(11): 529-532.
- [16] 熊宇龙, 匡欣薇, 陈卫国, 等. 壳寡糖的免疫调节效应及

其机制研究进展 [J]. 现代生物医学进展, 2009, 9(9): 1787-1789.

[17] 魏长征, 韩宝芹, 刘万顺, 等. 壳寡糖对绝经后骨质疏松症模型大鼠骨质量作用的研究 [J]. 中国海洋大学学报: 自然科学版, 2007, 37(3): 443-448.

[18] 邓丽莉, 黄艳, 周玉翔, 等. 壳寡糖处理对柑桔果实贮藏品质的影响 [J]. 食品工业科技, 2009, 30(7): 287-209.

[19] 郭卫华, 赵小明, 杜昱光. 壳寡糖对黄瓜种子萌发和幼苗生长及光合特性的影响 [J]. 中国农学通报, 2009, 25(3): 164-169.

[20] 商文静, 吴云锋, 商鸿生, 等. 壳寡糖诱导对烟草体内 TMV_CP 基因表达的抑制作用 [J]. 植物病理学报, 2007, 37(6): 637-641.

[21] 乔德亮. 低聚壳聚糖制备及其在功能食品中应用 [J]. 食品工业科技, 2007, 28(4): 228-231.

[22] Monaghan R L, Eveleigh D E, Tewari F P, et al. Chitosanase, a novel enzyme [J]. Nature New Biol, 1973, 245(142): 78-801.

[23] 吴绵斌, 夏黎明, 岑沛霖. 壳聚糖酶解的随机进攻动力学模型 [J]. 高校化学工程学报, 2001, 15(6): 552-556.

[24] Sini T K, Santhosh S, Mathew P T. Study on the production of chitin and chitosan from shrimp shell by using Bacillus subtilis fermentation [J]. Carbohydr Res 2007, 342(16): 2423-2429.

[25] Jung W J, Jo G H, Kuk J H. Production of chitin from red crab shell waste by successive fermentation with Lactobacillus paracasei KCTC-3074 and Serratia marcescens FS-3 [J]. Carbohydr Polym 2007, 68(4): 746-750.

[26] 王艳, 周培根, 俞剑桑, 等. 产壳聚糖酶菌株选育及培养条件优化 [J]. 中国海洋大学学报: 自然科学版, 2005, 35(2): 293-296.

[27] 邱乐泉, 楼坚, 潘加林. 壳聚糖酶产生菌的筛选、鉴定及其产酶条件优化 [J]. 浙江工业大学学报, 2005, 33(2): 148-151.

[28] 郑连英, 隋斯光. 产壳聚糖酶菌株的诱变育种及其产酶条件研究 [J]. 浙江大学学报: 工学版, 2004, 38(8): 1039-1042.

[29] 孙玉英, 张继泉, 王淑军. 壳聚糖酶高产菌株的筛选、鉴定及发酵条件的研究 [J]. 食品科学, 2009, 30(15): 164-168.

[30] 陈小娥, 夏文水, 余晓斌. 壳聚糖酶高产菌株选育及发酵条件研究 [J]. 食品与发酵工业, 2004, 30(3): 66-69.

[31] 朱江峰, 郑连英. 产壳聚糖酶菌种的选育和产酶条件的优化 [J]. 化工学报, 2000, 51: 219-222.

[32] 孙玉英, 韩宝芹, 刘万顺, 等. 壳聚糖酶高产菌株的筛选和发酵条件的研究 [J]. 中国海洋大学学报: 自然科学版, 2007, 37(2): 266-272.